(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2017 年 6 月 22 日 (22.06.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/101089 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C07K 14/685 (2006.01) *A61K 38/34* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/097783

(22) 国际申请日: 2015 年 12 月 18 日 (18.12.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: **兰州大学 (LANZHOU UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。

(72) 发明人: **李红玉 (LI, Hongyu)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。 **王梅竹 (WANG, Meizhu)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。 **支德娟 (ZHI, Dejuan)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。 **李洋 (LI, Yang)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。 **王娜 (WANG, Na)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。 **刘怡瑶 (LIU, Yiyao)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。 **裴月娟 (PEI, Yuejuan)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。 **宋美娟 (SONG, Meijuan)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。 **杨洋 (YANG, Yang)**; 中国甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号兰州大学 3002 信箱, Gansu 730000 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

WO 2017/101089 A1

(54) **Title**: FUSION PROTEIN FOR Á MELANOCYTE STIMULATING HORMONE AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) **发明名称**: 一种α促黑素细胞激素的融合蛋白及其制备方法和应用

(57) **Abstract**: Disclosed is a fusion protein for á melanocyte stimulating hormone, the fusion protein containing a protein transduction domain (PTD), a human serum albumin (HSA) and an á-melanocyte stimulating hormone (á-MSH). Also disclosed are a method for preparing the fusion protein and a use thereof for inhibiting or treating central nervous system inflammations.

(57) **摘要**: 公开了一种α促黑素细胞激素的融合蛋白，包含 1 个蛋白转导结构域(Protein transduction domian，PTD)，1 个人血清白蛋白(Albumin Human，HSA)和一个α促黑素细胞激素(α-Melanocyte stimulating hormone，α-MSH)。还公开了该融合蛋白的制备方法及其在抑制或治疗中枢神经系统炎症中的应用。

一种α促黑素细胞激素的融合蛋白及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于基因工程制药领域，具体涉及一种α促黑素细胞激素的融合蛋白及其制备方法和应用。

背景技术

血管损伤，炎症以及外伤引起的脑组织损伤会导致机体的认知功能障碍，这类疾病严重影响着人们的生活质量和工作效率。目前针对上述疾病的临床药物大多关注脑神经组织的修复和保护，事实上，除了神经细胞以外，星型胶质细胞、寡树突胶质细胞、内皮细胞以及小胶质细胞同样需要损伤后的修复。内源性免疫神经调节肽α促黑素细胞激素（α-Melanocyte stimulating hormone，α-MSH）具有潜在的抗炎，神经营养，抗凋亡效应。对上述疾病具有显著的治疗潜力，而且相对于传统的抗代谢免疫抑制剂副作用较小，在基础研究与临床治疗中都具有重要价值，有望成为新型的神经保护剂，是一种前景广阔的临床候选药物。

α-MSH 的免疫调节效应经下述途径产生：(1)直接作用于外周巨噬、单核和嗜中性粒细胞等免疫细胞上的 α-MSH 受体；(2)作用于脑内神经元上的 α-MSH 受体，进而启动下游抗炎神经通路；(3)中枢神经系统的局部炎症由局部产生的 α-MSH 通过作用于中枢小胶质细胞和星形细胞而被抑制，也可由外周细胞产生的 α-MSH 通过脑脊液循环作用于中枢。此外 α-MSH 的抗炎活性已经在多种动物模型中被证实。这些动物模型有刺激过敏性皮炎、接触过敏性皮炎、血管炎、关节炎、眼部炎症、胃肠炎、脑部炎症以及过敏性炎症。

在中枢神经系统炎症中，α-MSH 参与神经免疫调节通路的分子机制如下：α-MSH 由其受体介导，降低炎症反应中最大的调节器分子 NF-κB 的介导的转录活性，进而阻止前炎因子的释放，抑制粘着分子的表达，从而降低脑组织损伤，起到营养、保护、修复受损脑组织的作用。

α-MSH 主要由下丘脑,垂体和多种外周组织细胞产生，由 13 个氨基酸组成，大鼠静脉注射体内半衰期为几分钟，对于此类蛋白质药物来说，必须考虑肾小球滤过问题，因此，就要通过对 α-MSH 进行结构的修饰和改造或者其他方法来延长其半衰期。

HSA 是人体内源性蛋白，分子量达 66kDa，在人体内的半衰期达到 19 天，具有无免疫原性、人体相容性好、无酶活等特性，是许多内源性代谢物质和外源性药物的运输载体。上述特性使 HSA 成为长效蛋白/多肽类药物开发的一个理想载体。

因此，本发明利用白蛋白融合技术（Albumin Fusion technology）将 α-MSH 与 HSA 融合，两者之间加入具有特殊结构的柔韧性分子接头（连接肽），采用本发明公开的技术方案，不仅保证了融合蛋白的稳定性和生物活性，而且增加了分子量。

虽然现有技术中公开了通过融合蛋白的表达的策略可以延长目的蛋白的半衰期，但是融合蛋白的设计本身是一个程序复杂、影响因素众多的过程，仅通过序列的简单加和是无法实现 α-MSH 的稳定高效表达、延长其半衰期的目的的，这是本领域技术人员所公知的。

同时，为了使上述融合蛋白能够有效地跨过血脑屏障，治疗脑部炎症及相关疾病，本发明在融合蛋白氨基酸序列中加入了蛋白转导结构域（Protein transduction domian，PTD），PTD 是近年来发现的较理想的跨 BBB 转运载体，具有强大的运载功能，能够转运高于自身分子量 100 倍的大分子，可将外源性蛋白质、DNA、RNA、化学分子、磁珠、脂质体转运通过细胞膜，且此过程不受分子大小和种类的限制。

基于上述现状，发明人公开了一种 α 促黑素细胞激素的融合蛋白，该融合蛋白所具有的独特的氨基酸序列可以保证其在宿主体内高水平稳定表达，在保留 α-MSH 原有功能的同时，体内半衰期显著延长，同时能够跨过血脑屏障，治疗脑部炎症及相关疾病。

发明内容

本发明的目的在于提供一种 α 促黑素细胞激素的融合蛋白，该融合蛋白能在宿主体内高水平稳定表达，半衰期长，能够有效地跨过血脑屏障，治疗脑部炎症及相关疾病。

本发明的另一个目的在于提供一种 α 促黑素细胞激素的融合蛋白的制备方法。

本发明的另一个目的在于提供一种重组表达载体。

本发明的另一个目的在于提供一种宿主表达系统。

本发明的另一个目的在于提供一种 α 促黑素细胞激素的融合蛋白应用。

本发明所述的 α 促黑素细胞激素的融合蛋白，包含 1 个蛋白转导结构域（Protein transduction domian，PTD），1 个人血清白蛋白（Albumin Human，HSA）和一个 α 促黑素细胞激素（α-Melanocyte stimulating hormone，α-MSH）。

其中，所述融合蛋白包还含有连接肽 L， HSA 通过连接肽 L 与 α-MSH 连接。

所述 L 的 DNA 序列为 GGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGATCTGGT，氨基酸序列为 GGGGSGGGSG。

所述 PTD 位于融合蛋白的 N-末端，α-MSH 位于融合蛋白的 C-末端，融合蛋白用结构式表示为 PTD-HSA-L-α-MSH。

所述 PTD 具有 SEQ ID NO：2 所示的氨基酸序列，编码所述 PTD 的氨基酸序列的 DNA 序列如 SEQ ID NO：1 所示；或在该氨基酸序列中取代、缺失或插入氨基酸残基所得到的具有所述 PTD 的活性的氨基酸序列，及编码所述的氨基酸序列的 DNA 序列。

所述 HSA 具有 SEQ ID NO：4 所示的氨基酸序列，编码所述 HSA 的氨基酸序列的 DNA 序列如 SEQ ID NO：3 所示；或在该氨基酸序列中取代、缺失或插入氨基酸残基所得到的具

有所述 HSA 的活性的氨基酸序列，及编码所述的氨基酸序列的 DNA 序列。

所述 α-MSH 具有 SEQ ID NO：6 所示的氨基酸序列，编码所述 α-MSH 的氨基酸序列的 DNA 序列如 SEQ ID NO：5 所示；或在该氨基酸序列中取代、缺失或插入氨基酸残基所得到的具有所述 α-MSH 的活性的氨基酸序列，及编码所述的氨基酸序列的 DNA 序列。

所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO ：8 所示，编码所述融合蛋白的氨基酸序列的 DNA 序列如 SEQ ID NO ： 7 所示。

上述融合蛋白采用酵母细胞表达制备，所述酵母为嗜甲醇毕赤酵母（Pichia pastoris）。

本发明所述的 α 促黑素细胞激素的融合蛋白的制备方法，包含以下步骤 ：

①全基因合成 α-MSH 序列；

②通过 PCR 扩增获取 PTD-HSA 序列；

③使用融合延长 PCR 技术连接①中 α-MSH 与②中 PTD-HSA，通过 In-fusion 技术连接目的片段与载体，获得含编码所述 α 促黑素细胞激素的融合蛋白的 DNA 序列的重组酵母表达载体；其中，所述载体为 pPinkα-HC。

④将步骤③所述的重组酵母表达载体转化到感受态大肠杆菌 TOP10 细胞中，提取重组表达载体质粒后测序，将测序正确的质粒转化到宿主表达系统进行表达，即得所述融合蛋白。

其中，所述宿主表达系统为嗜甲醇毕赤酵母。

一种含有编码 α 促黑素细胞激素的融合蛋白氨基酸序列的 DNA 序列的重组表达载体。

一种含有上述的重组表达载体的宿主表达系统。

一种 α 促黑素细胞激素的融合蛋白在制备抑制或治疗中枢神经系统炎症的药物中的应用。

本发明的有益效果：

1.本发明利用人血清白蛋白融合技术将 α-MSH 与 HSA 融合，两者之间加入具有特殊结构及一定柔韧性的分子接头（连接肽），保证融合蛋白的稳定性和生物活性，有效地增加了分子量，实现 α-MSH 的稳定高效表达，达到延长其半衰期的目的。

2.本发明在融合蛋白氨基酸序列中加入了 PTD，在保留 α-MSH 原有功能的同时，能够有效地跨过血脑屏障，治疗脑部炎症及相关疾病。

3. 本发明所述的 α 促黑素细胞激素的融合蛋白可在制备抑制或治疗中枢神经系统炎症的药物中应用，适合在此领域大规模推广。

附图说明

图 1 载体 pPinkα-HC

图 2 载体 pPINKα-HC/PTD-HSA-L-α-MSH

具体实施方式

主要实验仪器:

移液枪、超净工作台(安泰)、磁力搅拌器、微波炉、高温蒸汽灭菌锅、-80℃低温冰箱(Forma)、超纯水仪(Millipore)、制冰机、离心机(Hitachi)、HDB-PLUS 型恒温金属浴、HZQ-F16OA 型恒温振荡培养箱(上海一恒)、PCR 仪(Applied Biosystems)、台式冷冻离心机(Thermo)、DYY-8B 型电泳仪(伯乐)、Image Quant 300 型凝胶成像仪(GE)等。

主要实验材料 :

1.限制性核酸内切酶 StuI、KpnI、XhoI、AflII (NEB 公司产品，美国)

2.小提质粒试剂盒、PCR 纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒(生工生物，中国)

3.T4 DNA 连接酶试剂盒 (Takara 公司产品，中国大连)

4.载体 pPinkα-HC、载体 pcDNA3.1-HSA、毕赤酵母菌株、Infusion 试剂盒 (Invitrogen 公司产品，美国)

5.大肠杆菌 TOP10(天根生化科技(北京)有限公司)

6.酵母提取物、蛋白胨 (Oxford 公司产品，美国)

7.LB 培养基

酵母提取物 5g，蛋白胨 10g，NaCl 10g，溶于 1000ml 去离子水中，并用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 7.0，高压蒸气灭菌。

8.YPD 培养基

酵母提取物 10g，胰蛋白胨 20g，Agar 20g，溶于 900ml 去离子水中，高压灭菌，冷却后加入 100ml 经滤器除菌后的 20% 的右旋糖。

9.YPDS 培养基

酵母提取物 10g，蛋白胨 20g，山梨糖醇 182.2g，溶于 900ml 去离子水中，高压灭菌，冷却后加入 100ml 经滤器除菌后的 20%的右旋糖。

10.BMGY 液体培养基

酵母提取物 10g，蛋白胨 20g，无氨基酸酵母氮源 13.4g，甘油 10g，磷酸钾 26.631g，溶于 1000ml 双蒸水中高压灭菌，冷至室温，调节 pH 至 6.0，4℃保存备用。

11. 1%琼脂糖凝胶的配置

根据用量，每 100ml 的 TAE 缓冲液，加入 1 g 琼脂糖，使用微波炉加热煮沸，使琼脂糖完全融解，室温冷却至不烫手时滴加少量溴化乙锭(EB)，混匀后将其倒入事先摆放好梳子的胶槽中，待到室温冷却至完全凝固后拔去梳子即可使用。

实施例 1 pPINKα-HC/PTD-HSA-L-α-MSH 和 pPINKα-HC/HSA-L-α-MSH 的融合蛋白酵母

表达载体的构建与表达

一、pPINKα-HC/PTD-HSA-L-α-MSH 载体的构建

1.设计 PCR 引物：

NFT1: TCTCTCGAGAAAAGGTACGGTAGAAAGAAACGTAGACAAAGACGTAGA

NFT2:GAAAGAAACGTAGACAAAGACGTAGA GATGCACACAAGAGTGAG

R2:GCTCCATAGAGTAAGAACCAGATCCACCTCCAGAACCTCCACCTCCTAAGCCTAAGG CAGCTTG

R1:TTAAATGGCCGGCCGGTACCttaAACTGGCTTACCCCATCTAAAGTGCTCCATAGAGTA AGAAC

2.第一轮 PCR 扩增：以 pcDNA3.1-HSA 质粒 DNA 为模版，以 NFT2 和 R2 分别作为上、下游引物，进行 PCR 扩增。反应条件如下：①变性：94℃，5min；②变性：94℃，1min；③复性：55℃，30S ；④延伸：72℃，2min；⑤返回步骤“②”，进行 35 循环；⑥延伸：72℃，5min，总循环次数为 30 次。将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果显示扩增出约 1.8kb 大小的部分 PTD-HSA-L-α-MSH 条带。

3.第二轮 PCR 扩增：以第一轮 PCR 扩增的产物为模板，以 NFT1 和 R1 分别作为上、下游引物，进行 PCR 扩增。反应条件如下：①变性：94℃，5min；②变性：94℃，1min；③复性：55℃，30S ；④延伸：72℃，2min；⑤返回步骤“②”，进行 35 循环；⑥延伸：72℃，5min，总循环次数为 30 次。将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果显示扩增出约 1.8kb 大小的完整 PTD-HSA-L-α-MSH DNA 条带，将以上 PCR 产物进行胶回收。

4.KpnI 和 StuI 双酶切 pPINKα-HC (Invitrogen 公司产品) 质粒 DNA，胶回收获得 pPINKα-HC(KpnI/StuI)载体片段，利用 Infusion 试剂盒将上述胶回收的 pPINKα-HC(KpnI/StuI) 载体片段和 PTD-HSA-L-α-MSH DNA 目的基因片段进行重组反应，反应产物转化大肠杆菌感受态 TOP10，涂于氨苄抗性 LB 板 37℃培养过夜，筛选阳性克隆。所得克隆送 Invitrogen 公司测序，序列正确的克隆命名为 pPINKα-HC/PTD-HSA-L-α-MSH。

二、pPINKα-HC/HSA-L-α-MSH 载体的构建

1.设计 PCR 引物：

NF: TCTCTCGAGAAAAGGGATGCACACAAGAGTGAG

R2:GCTCCATAGAGTAAGAACCAGATCCACCTCCAGAACCTCCACCTCCTAAGCCTAAGG CAGCTTGR1:TTAAATGGCCGGCCGGTACCttaAACTGGCTTACCCCATCTAAAGTGCTC CATAGAGTAAGAAC

2.第一轮 PCR 扩增：以 pcDNA3.1-HSA 质粒 DNA 为模版，以 NF 和 R2 分别作为上、下游引物，进行 PCR 扩增。反应条件如下：①变性：94℃，5min ；②变性：94℃，1min ；

③复性：55℃，30S ；④延伸：72℃，2min ；⑤返回步骤“②”，进行 35 循环；⑥延伸：72℃，5min，总循环次数为 30 次。将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果显示扩增出约 1.8kb 大小的部分 HSA-L-α-MSH 条带 。

3.第二轮 PCR 扩增：以第一轮 PCR 扩增的产物为模板，以 NF 和 R1 分别作为上、下游引物，进行 PCR 扩增。反应条件如下：①变性：94℃，5min；②变性：94℃，1min；③复性：55℃，30S；④延伸：72℃，2min；⑤返回步骤“②”，进行 35 循环；⑥延伸：72℃，5min，总循环次数为 30 次。将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果显示扩增出约 1.8kb 大小的完整 HSA-L-α-MSH DNA 条带，将以上 PCR 产物进行胶回收。

4.KpnI 和 StuI 双酶切 pPINKα-HC (Invitrogen 公司产品) 质粒 DNA，胶回收获得 pPINKα-HC(KpnI/StuI)载体片段，利用 Infusion 试剂盒将上述胶回收的 pPINKα-HC(KpnI/StuI)载体片段和 HSA-L-α-MSH DNA 目的基因片段进行重组反应，反应产物转化大肠杆菌感受态 TOP10，涂于氨苄抗性 LB 板 37℃培养过夜，筛选阳性克隆。所得克隆送 Invitrogen 公司测序，序列正确的克隆命名为 pPINKα-HC/HSA-L-α-MSH。

三、PTD-HSA-L-α-MSH 及 HSA-L-α-MSH 融合蛋白在酵母中的表达

将测序正确的 pPINKα-HC/PTD-HSA-L-α-MSH 质粒 DNA 和 pPINKα-HC/HSA-L-α-MSH 质粒 DNA 用 AflII 酶切回收后得到线性化的 pPINKα-HC/ PTD-HSA-L-α-MSH 及 pPINKα-HC/HSA-L-α-MSH 片段，分别转化嗜甲醇毕赤酵母，然后将转化菌液接种于 PAD 平板，30℃培养 3-4 天，挑取阳性克隆。将得到阳性克隆分别接种 BMGY 液体培养基，30℃培养 48 小时，然后转接至 BMMY 培养基中诱导表达，持续 96 小时后，1500rpm 低温离心 15 分钟，取上清，SDS- PAGE 电泳检测蛋白表达情况。融合蛋白 PTD-HSA-L-α-MSH 的分子量约为 70kDa，PTD-HSA-L-α-MSH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO ：8 所示，编码 PTD-HSA-L-α-MSH 的 DNA 序列如 SEQ ID NO ：7 所示；融合蛋白 HSA-L-α-MSH 的分子量约为 69kDa，HSA-L-α-MSH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO ：10 所示，编码 HSA-L-α-MSH 的 DNA 序列如 SEQ ID NO ：9 所示。

实施例 2 PTD-HSA-L-α-MSH 跨血脑屏障功能验证

实验材料

1. 实验仪器

注射器、移液枪、离心机(Hitachi)、超纯水仪(Millipore)、超声仪、恒温培养箱(上海一恒)、酶标仪(Thermo)等。HSA Elisa 试剂盒（Cygnus Technologies）

2. 实验动物

10 只标准体重昆明小鼠，购于兰州大学实验动物中心。

3. 实验方法

小鼠的分组及给药方式：

将 10 只昆明小鼠随机分为两组，体重 18～22g 左右：1-对照组（注射 HSA-L-α-MSH），2-α 促黑素细胞激素的融合蛋白组（注射 PTD-HSA-L-α-MSH）。

对照组尾静脉注射（150uL ，1 μm/kg） HSA-L-α-MSH。α 促黑素细胞激素的融合蛋白组尾静脉注射（150uL ，1 μm/kg）PTD-HSA-L-α-MSH。6 小时后，麻醉小鼠，取出海马组织，进行组织匀浆。ELISA 法检测海马组织匀浆中的 PTD-HSA-L-α-MSH 水平。

实验结果分析：

表 1

分组	HSA-L-α-MSH 组	PTD-HSA-L-α-MSH 组
PTD-HSA-L-α-MSH(ng/mL)	0.06±0.02	0.65±0.01

以上实验说明本发明提供 PTD-HSA-L-α-MSH 融合蛋白能有效地够跨过血脑屏障。

实施例 3　PTD-HSA-L-α-MSH 生物活性研究

实验材料

1.实验仪器

注射器、移液枪、离心机(Hitachi)、超纯水仪(Millipore)、超声仪、恒温培

养箱(上海一恒)、酶标仪(Thermo)等。TNF-a Elisa 试剂盒（达科为）

2.实验动物

20 只标准体重昆明小鼠，购于兰州大学实验动物中心。

3.实验方法

小鼠的分组及给药方式：

脂多糖 LPS (Lipopolysaccharides)即革兰氏阴性菌内毒素是革兰氏阴性细菌的细胞壁组成成分，小鼠侧脑室注射 LPS 能够引起大脑中的神经退行性病变及炎症反应，本实验以小鼠脑部海马组织中的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors a , TNF-a)为指标，检测本发明所述的 α-MSH 的融合蛋白在小鼠由 LPS 引起的脑补炎症模型中的药效。

将 20 只昆明小鼠分为四组，体重 18～22g 左右：1-对照组，2-LPS 组，3- PTD-HSA-L-α-MSH +LPS 组，4-a-MSH+LPS 组。对照组分两次注射 300μL 生理盐水，每次注射量为 150μL；LPS 组先注射 150 μL LPS (5mg/kg)，后注射 150 μL 生理盐水；3- PTD-HSA-L-α-MSH +LPS 组先注射 150 μL LPS (5mg/kg)，后注射 150 μL PTD-HSA-L-α-MSH（1μM/kg）；a-MSH+LPS 组先

注射 150 μL LPS (5mg/kg)，后注射 150μL a-MSH。2 小时后，处死小鼠，迅速取出海马组织，进行组织匀浆。本实验所述注射方式均为腹腔注射。

ELISA 法检测海马组织匀浆中的 TNF-α 水平。

实验结果分析：

分组	TNF-α（pg/mg）
对照组	14.8±4.2
LPS 组	191.9±9.1
LPS + PTD-HSA-L-α-MSH 组	38.3±18.3
LPS + α-MSH 组	155.8±10.3

与对照组相比，LPS 组小鼠海马组织中 TNF-α 明显升高，说明模型建立成功；与 α-MSH+LPS 组相比，PTD-HSA-L-α-MSH 组中小鼠海马组织中 TNF-α 显著降低，说明本发明所述 PTD-HSA-L-α-MSH 能够显著地降低中枢神经系统的炎症，更有力地证明 PTD-HSA-L-α-MSH 能够跨过血脑屏障，同时保持 α-MSH 的原有功效，用以治疗脑部炎症及相关疾病。

以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1.一种α促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白包含1个蛋白转导结构域（Protein transduction domian，PTD），1个人血清白蛋白（Albumin Human，HSA）和一个α促黑素细胞激素（α-Melanocyte stimulating hormone，α-MSH）。

2.根据权利要求1所述的一种α促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白还含有连接肽L， HSA通过连接肽L与α-MSH连接。

3.根据权利要求2所述的一种α促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述连接肽L的DNA序列为GGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGATCTGGT，氨基酸序列为GGGGSGGGSG。

4. 根据权利要求1所述的一种α促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述PTD位于融合蛋白的N-末端，α-MSH位于融合蛋白的C-末端，融合蛋白用结构式表示为 PTD-HSA-L-α-MSH。

5.根据权利要求1所述的一种α促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述PTD具有SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列，编码所述PTD的氨基酸序列的DNA 序列如SEQ ID NO：1所示；或在该氨基酸序列中取代、缺失或插入氨基酸残基所得到的具有所述PTD的活性的氨基酸序列，及编码所述的氨基酸序列的 DNA 序列。

6.根据权利要求1所述的一种α促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述HSA 具有SEQ ID NO：4 所示的氨基酸序列，编码所述HSA的氨基酸序列的 DNA 序列如SEQ ID NO：3所示；或在该氨基酸序列中取代、缺失或插入氨基酸残基所得到的具有所述HSA 的活性的氨基酸序列，及编码所述的氨基酸序列的 DNA 序列。

7.根据权利要求1所述的一种α促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述α-MSH具有SEQ ID NO：6所示的氨基酸序列，编码所述α-MSH的氨基酸序列的 DNA 序列如SEQ ID NO：5所示；或在该氨基酸序列中取代、缺失或插入氨基酸残基所得到的具有所述α-MSH的活性的氨基酸序列，及编码所述的氨基酸序列的 DNA 序列。

8.根据权利要求 1-7 中任意一项所述的一种 α 促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO ：8 所示，编码所述融合蛋白的氨基酸序列的 DNA 序列如 SEQ ID NO ： 7 所示。

9. 根据权利要求 8 所述的一种 α 促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白采用酵母细胞表达制备。

10. 根据权利要求 9 所述的一种 α 促黑素细胞激素的融合蛋白，其特征在于，所述的酵母为嗜甲醇毕赤酵母（*Pichia pastoris*）。

11. 一种如权利要求 4 所述的 α 促黑素细胞激素的融合蛋白的制备方法，其特征在于，所述方法包含以下步骤 ：

①全基因合成 α-MSH 序列；

②通过 PCR 扩增获取 PTD-HSA 序列；

③使用融合延长 PCR 技术连接①中 α-MSH 与②中 PTD-HSA，通过 In-fusion 技术连接目的片段与载体，获得含编码所述 α 促黑素细胞激素的融合蛋白的 DNA 序列的重组酵母表达载体；

④将步骤③所述的重组酵母表达载体转化到感受态大肠杆菌 TOP10 细胞中，将所述质粒转化到宿主表达系统进行表达，即得所述融合蛋白，其中，所述宿主表达系统为嗜甲醇毕赤酵母。

12. 一种含有编码如权利要求 1-7、9、10 中任意一项所述的 α 促黑素细胞激素的融合蛋白氨基酸序列的 DNA 序列的重组表达载体。

13. 一种含有权利要求 12 所述的重组表达载体的宿主表达系统。

14. 权利要求 1-7、9、10 中任意一项所述的 α 促黑素细胞激素的融合蛋白在制备抑制或治疗中枢神经系统炎症的药物中的应用。

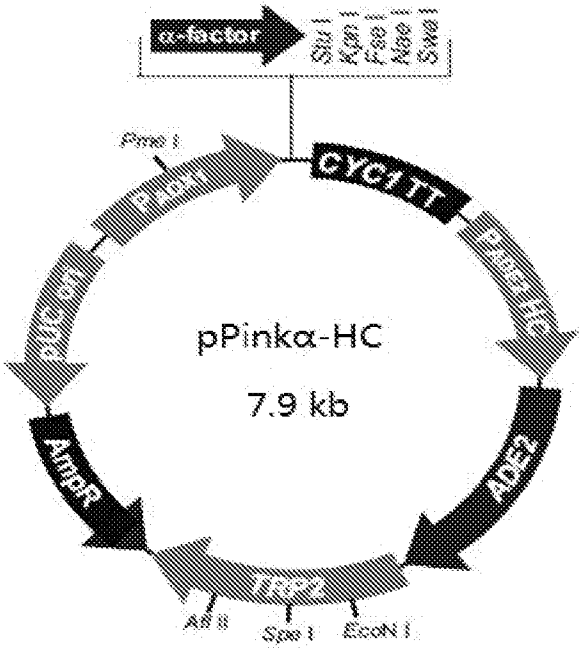

α-factor
Sfu I
Kpn I
EcoR I
Not I
Sma I
Pme I
PAOX1
CYC1 TT
pPinkα-HC
7.9 kb
PUC ori
AmpR
ADE2
TRP2
Afl II
Spe I
EcoN I

图 1

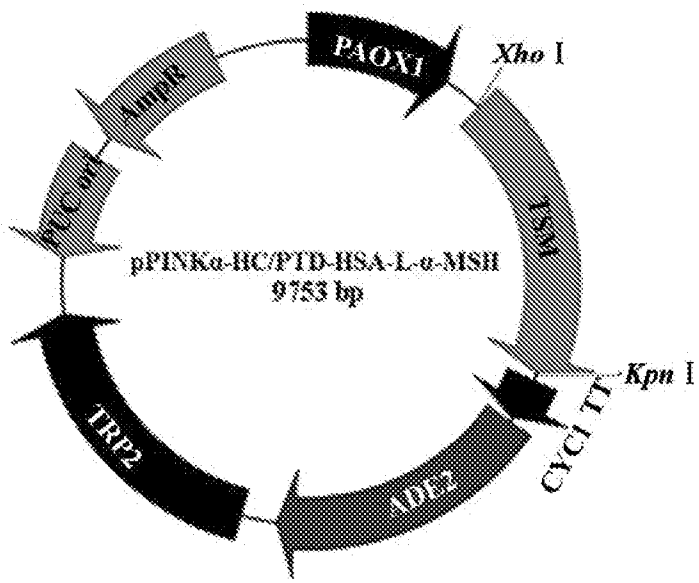

PAOX1
Xho I
AmpR
PUC ori
pPINKα-HC/PTD-HSA-L-α-MSH
9753 bp
TSA
Kpn I
CYC1 TT
TRP2
ADE2

图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/097783

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i; C07K 14/685 (2006.01) i; C12P 21/00 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61K 38/34 (2006.01) i; A61P 25/00 (2006.01) i

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; C12P; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; CNKI; ISI Web of Science and Key Words: ptd, MSH, fusion, hormone, tat, melanocyte stimulating hormone, fusion protein, human serum albumin, stimulating, albumin, melanocyte, hsa, conjugation, transduction, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101233151 A (NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC.), 13 July 2008 (13.07.2008), see the whole document	1-14
A	CN 101003568 A (JILIN AGRICULTURAL UNIVERSITY), 25 July 2007 (25.07.2007), see the whole document	1-14
A	WO 0206316 A2 (ZYCOS INC.), 24 January 2002 (24.01.2002), see the whole document	1-14
A	CN 102066421 A (THERATECHNOLOGIES INC.), 18 May 2011 (18.05.2011), see the whole document	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 September 2016 (02.09.2016)	**14 September 2016 (14.09.2016)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **JIA, Tao** Telephone No.: (86-10) **62411993**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/097783

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101233151 A	30 July 2008	None	
CN 101003568 A	25 July 2007	CN 100519577 C	29 July 2009
WO 0206316 A2	24 January 2002	AU 2001275930 B2	10 May 2007
		WO 0206316 A3	18 July 2002
		CA 2415938 A1	24 January 2002
		JP 2004506417 A	04 March 2004
		US 2007015257 A1	18 January 2007
		US 2005239170 A1	27 October 2005
		AU 7593001 A	30 January 2002
		US 7169603 B2	30 January 2007
		EP 1303625 A2	23 April 2003
CN 102066421 A	18 May 2011	AU 2008274845 A1	15 January 2009
		EP 2173773 A1	14 April 2010
		AP 200905091 D0	31 December 2009
		JP 2010532323 A	07 October 2010
		BR PI0812947 A2	23 December 2014
		MX 2009013372 A	22 February 2010
		WO 2009006732 A1	15 January 2009
		KR 20100029195 A	16 March 2010
		CA 2691898 A1	15 January 2009
		US 2009011997 A1	08 January 2009
		RU 2010103995 A	20 August 2011
		IL 202610 D0	01 August 2011
		EP 2173773 A4	07 July 2010
		US 8822413 B2	02 September 2014
		WO 2009006732 A9	05 March 2009

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/097783

A. 主题的分类

C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/685(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 38/34(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; C12P; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS;DWPI;CNKI;ISI Web of science和关键词:ptd，MSH，fusion，hormone，tat，促黑素细胞激素，融合蛋白，促黑激素，白蛋白，人血清白蛋白，转导，stimulating，albumin，melanocyte，hsa，conjugation，transduction，等

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101233151 A (纳斯泰克制药公司) 2008年 7月 30日 (2008-07-30) 见全文	1-14
A	CN 101003568 A (吉林农业大学) 2007年 7月 25日 (2007-07-25) 见全文	1-14
A	WO 0206316 A2 (ZYCOS INC) 2002年 1月 24日 (2002-01-24) 见全文	1-14
A	CN 102066421 A (瑟瑞技术公司) 2011年 5月 18日 (2011-05-18) 见全文	1-14

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2016年 9月 2日	2016年 9月 14日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	贾涛
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62411993

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/097783

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101233151	A	2008年 7月 30日	无			
CN	101003568	A	2007年 7月 25日	CN	100519577	C	2009年 7月 29日
WO	0206316	A2	2002年 1月 24日	AU	2001275930	B2	2007年 5月 10日
				WO	0206316	A3	2002年 7月 18日
				CA	2415938	A1	2002年 1月 24日
				JP	2004506417	A	2004年 3月 4日
				US	2007015257	A1	2007年 1月 18日
				US	2005239170	A1	2005年 10月 27日
				AU	7593001	A	2002年 1月 30日
				US	7169603	B2	2007年 1月 30日
				EP	1303625	A2	2003年 4月 23日
CN	102066421	A	2011年 5月 18日	AU	2008274845	A1	2009年 1月 15日
				EP	2173773	A1	2010年 4月 14日
				AP	200905091	D0	2009年 12月 31日
				JP	2010532323	A	2010年 10月 7日
				BR	PI0812947	A2	2014年 12月 23日
				MX	2009013372	A	2010年 2月 22日
				WO	2009006732	A1	2009年 1月 15日
				KR	20100029195	A	2010年 3月 16日
				CA	2691898	A1	2009年 1月 15日
				US	2009011997	A1	2009年 1月 8日
				RU	2010103995	A	2011年 8月 20日
				IL	202610	D0	2011年 8月 1日
				EP	2173773	A4	2010年 7月 7日
				US	8822413	B2	2014年 9月 2日
				WO	2009006732	A9	2009年 3月 5日